

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. März 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/018696 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q(74) Gemeinsamer Vertreter: TRANSMIT
GESELLSCHAFT FÜR TECHNOLOGIETRANS-
FER MBH; Kerkrader Strasse 3, 35394 Giessen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002747

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. August 2003 (15.08.2003)(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AU, BA,
BB, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD,
GE, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV,
MA, MG, MK, MN, MX, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
SC, SG, SY, TN, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 38 433.9 16. August 2002 (16.08.2002) DE(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): TRANSMIT GESELLSCHAFT FÜR TECH-
NOLOGIETRANSFER MBH [DE/DE]; Kerkrader
Strasse 3, 35394 Giessen (DE). JUSTUS-LIEBIG-UNI-
VERSITÄT GIESSEN [DE/DE]; Ludwigstrasse 23,
35390 Giessen (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): PRINZENBERG,
Eva-Maria [DE/DE]; Eisenstein 29, 35396 Giessen (DE).
ERHARDT, Georg [DE/DE]; Bahnhofstrasse 93, 35415
Pohlheim (DE).Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE ALLELIC STATE OF THE 5'-END OF THE β G(A)S1-CASEIN GENE(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES ALLELISCHEN ZUSTANDES AM 5'-ENDE DES α S1-KASEIN-
GENS(57) Abstract: The invention relates to a genetic marker on the 5'-end of the α S1-casein gene (CSN1S1) and of the casein gene-
complex and a method for the age and lactation independent typing of cows by determining the allelic state in said area. The invention
also relates to the use of said method for selecting organisms having a preferred allele, for example, in marker-assisted selection.(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen genetischen Marker am 5'-Ende des α S1-Kaseingens (CSN1S1) und des
Kaseingen-Komplexes und ein Verfahren zur alters- und laktationsunabhängigen Typisierung von Rindern durch Bestimmung des al-
lelischen Zustands in diesem Bereich, sowie die Verwendung dieses Verfahrens zur Auswahl von Organismen mit einem bevorzugten
Allel, beispielsweise in der markergestützten Selektion.

Patentanmeldung

Verfahren zur Bestimmung des allelischen Zustandes am 5'-Ende des α S1-Kaseingens

Die Erfindung betrifft einen genetischen Marker am 5'-Ende des α S1-Kaseingens (*CSN1S1*) und des Kaseingen-Komplexes und ein Verfahren zur alters- und laktationsunabhängigen Typisierung von Rindern durch Bestimmung des allelischen Zustands in diesem Bereich, sowie die Verwendung dieses Verfahrens zur Auswahl von Organismen mit einem bevorzugten Allel, beispielsweise in der markergestützten Selektion.

Stand der Technik

Das Vererbungspotential (im Hinblick auf den Milchproteingehalt und andere züchterisch relevante Merkmale) von Zuchttieren wird derzeit mittels der Zuchtwertschätzung anhand von Testpaarungen und Leistungserfassung der Nachkommen abgeschätzt. Der Nachteil dieses konventionellen Verfahrens ist offensichtlich, beim Rind vergehen zwischen der ersten Besamung mit einem Testbulle und dem Einsetzen der Laktation der ersten Töchter ca. 3 Jahre, bis zur Erfassung einer kompletten Laktation der Tochter also ca. 4 Jahre. Erst danach kann der Zuchtwert abgeschätzt werden. Bis dahin entstehen durch die Haltung der Bullen bis zum Vorliegen der ersten geschätzter Zuchtwerte und den Testpaarungen Kosten, die über diesen langen Zeitraum und in der Summe der Tiere erheblich sind. Für die Erfassung der Eigenleistung und Ermittlung eines Zuchtwertes bei Kühen gilt dies analog.

Daher werden seit einigen Jahren international Anstrengungen unternommen, mit Hilfe der Fortschritte in der Genomanalyse genetische Marker und direkte Gentests für züchterisch relevante Leistungsparameter zu entwickeln. Genomweite Markeranalysen haben dabei mit Hilfe der Kopplungsanalyse die Eingrenzung von Chromosomenbereichen, in denen leistungsbestimmende Genorte liegen – sogenannte QTL-Regionen (QTL = Quantitative Trait Loci) – ermöglicht. Derartige QTL-Studien und daraus resultierende Tests sind unter anderem in der WO 2000 36143 und der WO 2001 57250 A2/A3 beschrieben. Weitere Details der QTL-Analyse beim Nutztier und ein Verfahren, mit dem basierend auf QTL-Studien auch ursächliche Kandidatengene isoliert werden können beschreibt die DE 100 17 675 A1, deren Offenbarungsgehalt hier mit einbezogen wird.

Beim Rind und anderen zur Milchproduktion gezüchteten Spezies stellen die Milchmenge, Proteingehalte und Fettgehalte die entscheidenden Kriterien dar. Für diese Merkmale sind verschiedene QTL, unter anderem auf dem Chromosom BTA 6 identifiziert worden. Die potentiellen QTL-Regionen für Proteingehalte werden von verschiedenen Arbeitsgruppen relativ einheitlich mit dem Bereich um oder zwischen den Mikrosatellitenmarkern *BM143* und *TGLA37* und damit rund 20-30 Centimorgan (cM) vom Kaseinlocus entfernt angegeben (Spelman et al. 1996, *Genetics* 144, 1799-1808; Georges et al. 1995, *Genetics* 139, 907-920; Kühn et al. 1996, *J Anim Breed Genet* 133, 355-362; Zhang et al. 1998, *Genetics*

149, 1959-1973). Nach Nadesalingam et al. (2001, *Mammalian Genome* 12, 27-31) sind allerdings die Kaseingene aufgrund ihrer Position (40cM entfernt vom QTL) als Kandidat für die beobachteten QTL-Effekte ebenfalls ausgeschlossen.

Bereits seit Mitte der 80er Jahre wurden auch die genetisch bedingten Milch

5 proteinvarianten des Rindes im Hinblick auf einen Einfluss auf Milchmengen- und Milchqualitätsmerkmale untersucht. Dies erfolgte teils mittels Erfassung der phänotypisch (in der Milch) unterscheidbaren Proteinvarianten (Ng-Kwai-Hang et al., 1984, *J Dairy Sci* 67, 835-840 und Ng-Kwai-Hang et al., 1986, *J Dairy Sci* 69, 22-26), später auch mittels molekulargenetischer Verfahren, die die den Proteinvarianten zugrundeliegenden genetischen Mutationen nachwiesen (Sabour et al., 10 1996, *J Dairy Sci* 79, 1050-1056). Die bisherigen Untersuchungen zeigen dabei teilweise widersprüchliche Effekte der untersuchten Varianten, die sich zwischen Rassen und regionalen Herkünften nicht immer bestätigen lassen (zusammengefasst bei Prinzenberg, 1998, ISBN 3-922306-68-3, Kap 2.4, S. 14-21). Die Mehrzahl dieser Untersuchungen konzentriert sich auf die Varianten des β -Laktoglobulins, des β - und κ -Kaseins, da im α s1-Kasein nur zwei Proteinvarianten in nennenswerter Häufigkeit vorkommen und insbesondere in den bereits stark selektierten Milchrassen wie Holstein Friesian / Deutsche Holstein nahezu ausschliesslich die Proteinvariante α s1-Kasein B zu finden ist (Ng-Kwai-Hang et 15 al., 1990, *J Dairy Sci* 73, 3414-3420; Erhardt et al., 1993, *J Animal Breed Genet* 36, 145-152; Lien et al., 1999, *Animal Genetics* 30, 85-91). In einer neueren Untersuchung an Milchrindern mit unterschiedlichem Holstein Blutanteil (Freyer et al., 1999, *J Animal Breed Genet* 116, 87-97) wurde α s1-Kasein in den Kopplungsanalysen ebenfalls nicht verwendet, da keine ausreichende Variabilität vorhanden 20 war.

Zur molekulargenetischen Differenzierung der α s1-Kaseinvarianten B und C sind verschiedene Tests beschrieben (David & Deutch 1992, *Animal Genetics* 23, 425-429; Schlee & Rottmann 1992, *J Anim Breed Genet* 109, 316-319). Für die seltenen Allele A, D und F existieren ebenfalls einzelne Gentestverfahren (Prinzenberg 1998, ISBN 3-922306-68-3; Kap Kap 4.1, S 61-71), wie auch für den 30 Nachweis einer quantitativen Variante α s1-Kasein G (Mariani et al 1995, *L'industria del Latte* 31, 3-13). Schild & Geldermann (1996) zeigten mittels Sequenzierung von rund 1000 Basenpaaren (bp) aus dem 5'-Bereich des α s1-

Kaseingens bei verschiedenen Rinderrassen 17 variable Positionen im 5'-flankierenden Bereich des *CSN1S1* Gens, von denen 5 aufgrund variabler Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen mit Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (PCR-RFLP) nachweisbar waren. Nach Ehrmann et al. (1997, *J Animal Breed Genet* 114, 121-132) sind die 5'-flankierenden Varianten jeweils mit bestimmten Proteinallelen gekoppelt, so dass von den vorhandenen Proteinvarianten auch auf bestimmte Varianten im 5'-flankierenden Bereich geschlossen werden kann. Einen Gentest zur Unterscheidung von α s1-Kasein B und C bei Deutschen Schwarzbunten, Fleckvieh und Jersey-Kühen, welcher auf einem Fragment aus dem 5'-flankierenden Bereich des α s1-Kaseingens basiert, beschrieben auch Koczan et al. (1993, *Animal Genetics* 24, 74). Für den letztgenannten Test wurde die strikte Kopplung mit den Proteinvarianten α s1-Kasein B und C und damit die Gültigkeit für die Rassen Aberdeen Angus, Anatolisches Schwarzvieh, Angler, Asturian Valley, Ayrshire, British Frisian, Casta Navarra, Charolais, Chianina, Fighting Bull, Hereford, Jersey, Maremmana, Pezzata Rossa, Piemonteser, Scottish Highland, Türkisches Graues Steppenrind inzwischen jedoch widerlegt (Jann et al., 2001; *Arch. Tierz, Dummerstorf* 45, 13-21).

Die Kaseingene sind als eng gekoppelter Genlocus beim Rind und beim Schaf auf Chromosom 6, beim Menschen auf Chromosom 4 und bei der Maus auf Chromosom 5 kartiert. Auch für andere Tierarten (Kaninchen, Schwein, Ziege) ist die Kopplung der Kaseingene nachgewiesen. Aufgrund dieser engen Kopplung, ist die derzeitige Angabe der Lokalisation des α s1-Kaseingens in genetischen Karten beim Rind an die Lokalisation des κ -Kaseingens gebunden. Für beide Gene wird in der aktuellen Genkarte des Rindes die physische Position BTA6q31-33 und die genetische Position 82,6 cM (MARC97) bzw. 103,0 cM (IBRP97) angegeben. Die Rekombinationsrate zwischen α s1-Kasein- und κ -Kaseingen wird damit als Null angenommen.

Die Nutzung einer Lactalbuminsequenz für die Auswahl von Zuchttieren ist in der EP0555435 offenbart. Für das bovine κ -Kasein existieren ebenfalls zahlreiche Gentests (Denicourt et al., 1990, *Animal Genetics* 21, 215-216; Medrano & Aguilar-Cordova, 1990, *Biotechnology* 8, 144-145; Pinder et al., 1991, *Animal Genetics* 22, 11-20; Schlee & Rottmann, 1992, *J Animal Breed. Genet.* 109, 153-155; Zadworny & Kuhnlein, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 80, 631-634), da diesem

Protein Einflüsse auf die Verarbeitungseigenschaften und die Käseereignung der Milch zugeschrieben werden (siehe Lodes et al., 1996, *Milchwissenschaft* 51, 368-373 und 543-548).

Aufgrund der milchdrüsenspezifischen Expression werden die Promotoren der
5 bovinen Milchproteingene und die des α s1-Kaseingens auch bei der Erstellung von transgenen Tieren und zur Expression in Zellkulturen genutzt. Die DE 38 54 555 T2, deren Offenbarungsgehalt hier mit einbezogen wird, beschreibt die Verwendung des α s1-Kaseinpromotors und des Signalpeptids zur Produktion von rekombinanten Proteinen in der Milch von Säugetieren. Einen Überblick über
10 die Nutzung von transgenen Tieren zur Produktion von rekombinanten Proteinen und die dazu verwendeten Promotoren gibt auch Rudolph (1999, *Trends in Biotechnology (TIBTECH)* 17, 367-374).

Einen direkten Gentest für ein Gen aus dem Fettsäurestoffwechsel (*DGAT1*) beschreiben Winter et al. (2002, *PNAS* 99, 9300-9305) und schreiben diesem
15 Gen einen Effekt auf den Milchfettgehalt zu.

Der Nachteil aller Verfahren, die basierend auf einer Milchprobe die genetischen Varianten phänotypisch (d.h. in Milchproben) differenzieren besteht darin, dass nur laktierende Kühe untersucht werden können. Daher besteht der Bedarf, die
20 Tiere laktationsunabhängig untersuchen zu können. Weiterhin stellen die im codierenden Bereich der Milchproteingene nachgewiesenen Polymorphismen nach derzeitigem Stand der Technik keine zuverlässigen Marker für Milchleistungsmerkmale dar. Die bisherigen QTL-Analysen weisen auf einen ausserhalb der Milchproteingene liegenden QTL hin.

Für α s1-Kasein ist derzeit kein Marker mit ausreichender Variabilität vorhanden, so dass sich dieses Gen einer näheren Analyse von Effekten auf Milchleistungs- und Inhaltsstoffmerkmale weitgehend entzieht. Alle vorhandenen Testverfahren beruhen auf der molekulargenetischen Differenzierung der auch phänotypisch vorhandenen Variation.

Die Mikrosatellitenmarker, welche bei QTL-Analysen ermittelt wurden, eignen sich
30 nur bedingt zum Einsatz in der markergestützten Selektion, da die jeweilige Marker-QTL-Kopplung zunächst geklärt werden muss. Es handelt sich bei diesen

Mikrosatellitenmarkern jeweils um indirekte Tests, die je nach Dichte der Koppelung zum ursächlichen Genort eine reduzierte Aussagesicherheit haben.

Der Nachteil des Verfahrens der EP 0555435 besteht darin, dass α -Lactalbumin nur einen geringen (ca. 2-5%) Anteil des gesamten Milcheiweiss ausmacht. Den
5 größten Anteil stellen die Kaseine (α s1-, α s2-, β - und κ -Kasein) mit rund 80% am Gesamteiweiss dar. Daher ist bei Anwendung dieses Selektionsmarkers nur ein geringer züchterischer Fortschritt zu erwarten.

Der Gentest für *DGAT1* von Winter et al. hat den Nachteil, dass aus Sicht der Züchter und der Milcherzeuger der Fettgehalt der Milch nicht das primäre Interesse geniesst, sondern hinter dem Proteingehalt zweitrangig ist.
10

Der Nachteil des Verfahrens der DE 38 54 555 T2 besteht darin, dass der verwendete Anteil des α s1-Kaseinpromotors nicht näher anhand einer Nukleotidsequenz charakterisiert ist. Es wird ein 9kb Fragment mit den Exons I und II, welches durch die Schnittstellen für *KpnI* und *BamHI* flankiert wird, verwendet. Es
15 erfolgt keine Berücksichtigung der genauen Basenfolge oder von möglichen Variationen, die die Effektivität der Expression mit diesem Abschnitt des Promotors beeinflussen können.

Der Nachteil des Testverfahrens von Koczan et al. (1993, *Animal Genetics* 24, 74) besteht darin, dass zum einen die Zuverlässigkeit der Differenzierung zwischen
20 den Varianten α s1-Kasein B und C (für die der Test entwickelt wurde) inzwischen widerlegt wurde, zum anderen ist mit dem Verfahren nur eine einzige Position der Basensubstitution nachweisbar und weitere Mutationen in diesem Bereich bleiben unberücksichtigt.

Derzeit gibt es keinen zuverlässigen Marker für Milchproteingehalt und keinen
25 direkten genetischen Test für einen funktionalen Genabschnitt, um Tiere alters- und laktationsunabhängig auf ihr genetisches Potential hin zu testen.

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es daher einen genetischen Marker und ein Verfahren
30 zur Typisierung auf Milchleistungsmerkmale bereitzustellen, um Tiere alters- und laktationsunabhängig auf Milchleistungsmerkmale anhand ihres genetischen Materials zu untersuchen.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt durch Bereitstellung eines auch in selektierten Milchrassen polymorphen genetischen Markers in der α s1-Kaseingenregion und eines Verfahrens, das eine alters- und laktationsunabhängige Typisierung der Tiere, die genetische Kartierung des α s1-Kaseingens, die Untersuchung von eng an diesen Genort gekoppelten oder direkt dadurch hervorgerufenen Effekten und eine züchterische Nutzung ermöglicht.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um einen genetischen Test für einen funktionalen Genabschnitt, die Aussagesicherheit ist größer als bei gekoppelten Markern und das Test-Ergebnis liegt innerhalb weniger Tage bis hin zu Stunden vor. Anhand dieses Tests können auch Zuchttiere ausgewählt werden, die mit höherer Wahrscheinlichkeit positive Vererbungseigenschaften haben, so dass die Anzahl Testpaarungen und zu testenden Tiere verringert werden können, wodurch die erheblichen Kosten der Testpaarungen reduziert werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren beseitigt somit die beschriebenen Nachteile im Stand der Technik.

Mit dem erfindungsgemäßen Marker ist auch die Auswahl von besonders vorteilhaften Promotoren zur Erzeugung von Expressionsvektoren und transgenen Tieren möglich.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform besteht die Erfindung aus einem Testkit, der die Oligonukleotide zur Anreicherung eines Teilbereiches der Markersequenz des α s1-Kaseingens, vorzugsweise die Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3'), Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3') und Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3') sowie Referenzproben für eine oder mehrere Sequenzen der Markersequenz des α s1-Kaseingens und dessen Allele enthält.

Folgende Abbildungen sind der Beschreibung beigelegt:

Abbildung 1 DNA-Sequenz aus dem 5'-flankierenden Bereich des α s1-Kaseingens, im folgenden als Markersequenz bezeichnet.

Abbildung 2 Alignment der Nukleinsäuresequenzen der allelischen Zustände des α s1-Kaseingens Allel 1, Allel 2, Allel 3, Allel 4 (Unterschiede in potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind hervorgehoben)

Abbildung 3 Schematische Darstellung der Wanderungsmuster der Allele 1 bis 4 des Markers *CSN1S1* in der SSCP-Analyse

Abbildung 4 Ergebnis der Varianzanalyse

5

Überraschender weise wurde gefunden, dass der untersuchte Sequenzabschnitt, welcher durch die Oligonukleotide CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r bzw. CSN1S1pro2r begrenzt wird (grauer Kasten in Abbildung 1) innerhalb der Rasse Deutsch Holstein vier mittels einer Einzelstrang-Konformationspolymorphismen-Analyse detektierbare Allele aufweist und damit ausreichend polymorph ist, um eine genetische Kartierung und Analysen zum Effekt der Allele auf Milchleistungsparameter durchzuführen.

Es handelt sich dabei um einen 1061 bp großen Abschnitt aus dem 5'-flankierenden Bereich und des Exon 1 (siehe Abbildung 1), im besonderen um den 654 bp großen Abschnitt, der durch die beiden Oligonukleotide CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r begrenzt wird.

Die vier Allele wurden kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigt bis auf die Länge des poly-T (ab Position 390 der Abbildung 1) Übereinstimmung von Allel 2 mit der von Koczan et al. (1991, Nucleic Acids Research 19, 5591-56596; Genbank Acc. No. X59856) publizierten Sequenz. Die Allele 1, 3 und 4 unterscheiden sich durch verschiedene Substitutionen und Deletionen von dieser Sequenz. Die variablen Positionen sind im Sequenzalignment (Abbildung 2) hervorgehoben. In den Allelen 1 und 4 sind jeweils potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durch Mutationen betroffen. Im Allel 1 fallen demnach zwei potentielle Bindungsstellen (für AP-1 und YY1) weg, wohingegen im Allel 4 eine potentielle ABF1-Bindungsstelle neu entsteht.

Der gefundene Polymorphismus ist damit in einer vermutlich funktionalen Genregion lokalisiert und somit ein geeigneter Marker für Milchleistungsmerkmale, insbesondere für den Proteingehalt.

Der Sequenzabschnitt wird mit folgenden erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen flankiert, die als Primer für die Amplifikation mittels PCR verwendet werden, wobei die Kombinationen Primer 1 mit Primer 2 und Primer 1 mit Primer 3 möglich sind:

Primer 1: CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2: CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Primer 3: CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')

- 5 Die Primerbindungsstellen sind in der Abbildung 1 grau unterlegt.

Es wird ein erfindungsgemäßes Verfahren bereitgestellt, das direkt am Erbmateri-
al des zu untersuchenden Organismus durchgeführt werden kann. Mit Hilfe des
erfindungsgemäßen Markers wird eine genetische Kartierung des α s1-Kaseingens
10 innerhalb der Kopplungskarte ermöglicht und die Ermittlung des allelischen
Zustands bei einzelnen Organismen, z.B. Rindern, vorgenommen, die innerhalb
weniger Stunden das genetische Potential im Hinblick auf Milchproteingehalt
ermittelt.

Das Verfahren zur Ermittlung des genetischen Potentials im Hinblick auf Milchpro-
15 teingehalt durch Ermittlung des allelischen Zustands des erfindungsgemäßen
Markers besteht im Einzelnen aus:

1. Bereitstellung des genetischen Materials des zu untersuchenden Organismus,
eines männlichen oder weiblichen Zuchtrindes oder eines Embryos.

Der Organismus ist dabei definitionsgemäß ein Tier, insbesondere ein Säugetier,
20 im besonderen ein Rind, ein Schaf oder eine Ziege einschließlich Embryonen
dieser Spezies.

Der Organismus ist auch ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO),
welcher den beschriebenen Sequenzabschnitt aus dem α s1-Kaseingen und des
5'-flankierenden Bereich (Abbildung 1) oder Teile dessen enthält.

- 25 Das genetische Material ist definitionsgemäß genomische DNS oder RNS von
Tieren, aber auch Plasmid-DNS aus Bakterien, von artifiziellen Chromosomen wie
BACs und YACs oder für spezielle Anwendungen erstellte Konstrukte aus geni-
tischem Material verschiedener Organismen, z.B. zur Herstellung von Transgenen.

Das Ausgangsmaterial zur Gewinnung von DNS- oder RNS-haltigem Material ist
30 z.B. Blut, Leukozyten, Gewebe einschließlich Biopsiematerial, Milch, Sperma,
Haare, einzelne Zellen einschließlich Zellmaterial aus Embryonen, eine Bakterien-
kultur oder auch isolierte Chromosomen. Weiterhin ist auch bereits zuvor amplifi-

ziertes genetisches Material, welches die Markersequenz (Abbildung 1) oder Teile daraus enthält, erneut Ausgangsmaterial.

2. Gezielte Isolierung oder Anreicherung des Sequenzabschnitts der Abbildung 1
5 oder einer Sequenz, die Teilbereiche davon enthält, vorzugsweise den dargestellten Sequenzabschnitt Position 1 bis 655 der Abbildung 1.

Die Isolierung des genetischen Materials erfolgt nach Standardmethoden, wie sie z.B. im Handbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989; Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York) beschrieben sind oder kann mittels
10 kommerziell erhältlicher Kits (z.B. Nucleospin, Machery Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt werden.

Die Anreicherung erfolgt vorzugsweise mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR, Mullis & Falloona, 1987, *Methods in Enzymology* 155, 335-350), wobei auch fluoreszenzmarkierte, radioaktiv oder chemisch markierte Primer eingesetzt
15 werden können. Bei Verwendung von RNS als genetisches Material wird zweckmäßigerweise eine vorherige reverse Transkription (Myers & Gelfand 1991, *Biochemistry* 30, 7661-7666) durchgeführt.

Der Sequenzabschnitt wird vorzugsweise mit folgenden erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen als Primer für die Amplifikation angereichert, wobei die
20 Kombinationen Primer 1 mit Primer 2 und Primer 1 mit Primer 3 möglich sind:

Primer 1: CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2: CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Primer 3: CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')

- 25 Die Auswahl weiterer Primer, die die Amplifikation einer Teilsequenz der in Abbildung 1 beschriebenen Sequenz ermöglicht, innerhalb derer variable Nukleotidpositionen zur Unterscheidung der Allele 1 bis 4 liegen, ist ausdrücklich möglich.

3. Nachweis des allelischen Zustands im isolierten oder angereicherten Sequenzbereich der Abbildung 1, vorzugsweise innerhalb der Teilsequenz, die durch
30 CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r begrenzt wird.

Zur Bestimmung des allelischen Zustands stehen eine Reihe von Standard-Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, zur Verfügung, wie die Sequenzierung nach Sanger et al. 1977, das Verfahren des Pyrosequencing (www.pyrosequencing.com), durch Darstellung von Einzelstrang Konformationspolymorphismen (SSCP, Orita et al. 1989, *Genomics* 5, 874-879), mittels Restriktionsfragment Längenpolymorphismen (RFLP; Botstein et al. 1980, *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331) und PCR-RFLP (Damiani et al. 1990, *Animal Genetics* 21, 107-114; Medrano & Aguilar-Cordova 1990, *Animal Biotechnology* 1, 73-77), allelspezifischer PCR (= ARMS, ASPCR, PASA; Newton et al. 1989, *Nucleic Acids Research* 17, 2503-2516; Sakar et al. 1990, *Analytical Biochemistry* 186, 64-68; David & Deutch 1992, *Animal Genetics* 23, 425-429), Oligonukleotid-Ligations-Test (= OLA; Beck et al. 2002, *J Clinical Mikrobiol* 40, 1413-1419), Temperaturgradienten Gel Elektrophorese (= TGGE, Tee et al. 1992, *Animal Genetics* 23, 431-435) und analoge, zum Stand der Technik gehörende Verfahren.

Es wird vorgeschlagen, die erfindungsgemäßen Primer mit einer Markierung (Fluoreszenz, Radioaktivität und ähnliches) zu versehen und die Bestimmung des allelischen Zustands am Sequenzierautomaten, durch Autoradiografie oder Chemilumineszenz durchzuführen. Bei Verwendung nicht-markierter Primer erfolgt die Bestimmung des allelischen Zustands durch Darstellung der Fragmente nach Gelelektrophorese durch Färbung der Nukleinsäuren, z.B. mit Ethidiumbromid (Sambrook et al., 1989) oder im Silberfärbeverfahren (Bassam et al 1991, *Analytical Biochemistry* 196, 80-83).

Weiterhin ist es möglich, verschiedene Hochdurchsatzverfahren zum Mutationsnachweis, darunter die Verwendung von Oligonukleotid-Arrays (Dong et al 2001, *Genome Research* 11, 1418-1424), das TaqMan-Verfahren (Ranade et al 2001, *Genome Research* 11, 1262-1268), Fluoreszenz-Polarisationsverfahren (Chen et al 1999, *Genome Research* 9, 492-498), Massenspektrometrische Verfahren (MALI-TOF; Sauer et al. 2002, *Nucleic Acids Research* 30, e22) einzusetzen. Diese Aufzählung ist beispielhaft und nicht limitierend zu verstehen.

Der allelische Zustand ist dabei als das Vorhandensein einer bestimmten Nukleotidsequenz innerhalb des angereicherten Bereiches zu verstehen. Abbildung 2

zeigt beispielhaft die Nukleinsäuresequenz von vier verschiedenen allelischen Zuständen des erfindungsgemäßen Markers (Abbildung 2, Allele 1, 2, 3 und 4).

Im Falle der Sequenzierung muss ein Vergleich mit den korrespondierenden Nukleotidsequenzen in Abbildung 2 1, 2, 3 und 4 erfolgen, um die zu Typ Allel 1
5 bis Allel 4 analogen Zuordnungen vorzunehmen. Basierend auf den angegebenen Nukleotidsequenzen ist es einer mit dem Stand der Technik vertrauten Person auch möglich, die benötigten Restriktionsenzyme und Fragmentlängen bei einer PCR-RFLP Analyse zu bestimmen oder Oligonukleotide zum Nachweis über allelspezifische PCR (ASPCR) zu konzipieren. Auch die Anpassung der weiteren
10 zuvor genannten Techniken zum Mutationsnachweis ist dem Fachmann möglich.

Besonders vorteilhaft ist die Darstellung der allelischen Zustände mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP), da der allelische Zustand direkt anhand des Fragmentmusters abzulesen ist. Das Verfahren ermöglicht zusätzlich zur Detektion der hier beschriebenen 4 Allele auch die Erkennung von weiteren,
15 hier nicht beschriebenen Mutationen. Aus diesem Grund eignet es sich besonders gut auch zur Analyse des homologen Genombereiches bei anderen Tierarten als beim Rind. Um die Dauer der Gelelektrophorese zu reduzieren, ist die Verwendung eines kürzeren Fragmentes beispielsweise die in Abbildung 1 mit Pfeil markierte Sequenz, die durch die erfindungsgemäßen Oligonukleotide festgelegt
20 wird, als der kompletten Sequenz empfehlenswert.

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der Allele 1 bis 4 des Markers CSN1S1 in der SSCP-Analyse im 12%igen Acrylamid:Bisacrylamid 49:1 Gel mit 1% Glycerolzusatz. Die Felder 1 bis 4 repräsentieren die vier verschiedenen Auftrennungsmuster der Allele. Die Wanderungsrichtung der Moleküle im elektrischen
25 Feld von Kathode (-) zur Anode (+) ist mit einem Pfeil dargestellt. Die Einzelstränge der Allele zeigen ein typisches, deutlich voneinander verschiedenes Auftrennungsmuster. Da mittels Silberfärbung beide DNS-Einzelstränge dargestellt werden, ist jedes der Allele durch zwei Banden charakterisiert.

4. Auswahl von Organismen, die den jeweils vorteilhaften allelischen Zustand des
30 erfindungsgemäßen Markers tragen. Dies kann z.B. der allelische Zustand 1 oder 4 sein, welcher sich von Allel 2 durch die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren unterscheidet.

Ausführungsbeispiele

1. Verfahren zur Typisierung auf Milchleistungsmerkmale durch Ermittlung des allelischen Zustands des erfindungsgemäßen Markers

- 5 Als Ausgangsmaterial wird Rinderblut verwendet. Die Isolierung des genetischen Materials (genomische DNS) erfolgt nach der Hochsalzmethode von Montgomery & Sise (1990, *NZ J Agric Res* 33, 437-441).

Für die Durchführung der Amplifizierung des Markers mittels PCR-Reaktion werden die erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen als Primer verwendet:

- 10 Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

- Die Reaktionsansätze enthalten in 15µl jeweils 20-100 ng zu testende genomische DNS, 10pmol jedes Oligonukleotids CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r, 0,5 U Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie, Erlangen), 50 µM dNTPs in einem
15 Standardpuffer (10mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5mM MgCl₂). Das Temperaturprogramm (in einem Thermocycler Modell iCycler der Firma Biorad) wird wie folgt gewählt: 1 min. – 93°C (1x), (40 sec – 91°C, 40 sec. 57°C, 40 sec – 70°C) (30x) und 3 min – 70°C (1x). Danach erfolgte die Kühlung auf 4°C.

- Jedem Reaktionsansatz werden anschließend je 25µl eines Formamid-Denaturierungspuffers zugegeben (95% Formamid, 0,025% (w/v) Bromphenolblau, 0,025% (w/v) Xylencyanol (FF), 20 mM EDTA), die Mischung für 2 min bei 93°C erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und je 4µl der Mischung auf ein 12%iges 49:1 Acrylamid-Bisacrylmidgel mit 1% Glycerolzusatz geladen. Die Auftrennung erfolgt über 20h bei 420V und 10°C in einer Vertikalelektrophoresekammer Modell
25 Pengiun P9DS (OWL Scientific, Woburn, USA) mit einem 0,8 mm dünnen 16x16cm großen Gel. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Nach der Elektrophorese werden die Gele mit Silbernitrat nach dem Protokoll von Bassam et al. (1990, *Analytical Biochemistry* 196, 80-83) gefärbt. Die Entwicklungsreaktion wird durch Überführen der Gele in eiskalte 0,04M EDTA-Lösung
30 gestoppt.

Das Wanderungsmuster der Allele 1 bis 4 zeigt schematisch Abbildung 3. Da mittels Silberfärbung beide DNS-Stränge (codierender und nicht-codierender DNS-Strang) angefärbt werden, sind jeweils zwei Fragmente pro Allel vorhanden.

5 2. Darstellung der Variabilität der Markers *CSN1S1* bei verschiedenen Rinderrassen

Aus DNS von 83 Rindern der Rassen Deutsche Schwarzbunte (6 Rinder), Deutsches Rotvieh (4 Rinder), Gelbvieh (7 Rinder), Deutsch Holstein (18 Rinder), Fleckvieh (9 Rinder), Jersey (13 Rinder), Pinzgauer (20 Rinder) und Simbrah (6 Rinder) wird mit den erfindungsgemäßen Oligonukleotiden *CSN1S1*pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3') und *CSN1S1*pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3') die in Abbildung 1 dargestellte Nukleinsäuresequenz Position 1 bis 655 mittels PCR amplifiziert. Das weitere Vorgehen erfolgt wie unter Beispiel 1 beschrieben.

15

In den untersuchten Rassen tauchen die typischen, wie in Abbildung 3 gezeigten Auftrennungsmuster auf.

20 3. Darstellung der Variabilität der Markers *CSN1S1* innerhalb der Rasse Deutsch Holstein

Aus Blutproben von 503 Kühen der Rasse Deutsch Holstein wird DNA nach der Methode von Montgomery & Sise (1990, *NZ J Agric Res* 33, 437-441) isoliert. Die Anreicherung der in Abbildung 2 dargestellten Sequenz erfolgt mit den erfindungsgemäßen Oligonukleotiden *CSN1S1*pro1f und *CSN1S1*pro1r wie oben beschrieben, die Darstellung der vorhandenen Variationen erfolgt mittels SSCP-Technik. Bei den untersuchten Kühen dieser Rasse sind alle ebenfalls vier Allele nachweisbar. Folgende Allelfrequenzen werden bestimmt:

Allel 1 - 0,031	Allel 2 - 0,739
Allel 3 - 0,194	Allel 4 - 0,036

30

Das Allel 2 stellt damit das häufigste Allel in Rasse Deutsch Holstein dar, gefolgt von Allel 3 und den zwei seltenen Allelen 1 und 4.

Die Genotypen treten in der Häufigkeit $22 > 23 > 24 > 12 > 33 > 34$ auf. Die Genotypen 11 und 14 sowie die Kombination dieser zwei seltenen Allele (Genotyp 14) werden bei den untersuchten Kühen nicht gefunden.

4. Genetische Kartierung des Markers *CSN1S1*

Mittels des erfindungsgemäßen Verfahren mit dem Marker *CSN1S1* werden acht Halbgeschwisterfamilien der Rassen Deutsch Holstein (7) und Fleckvieh (1) typisiert und mit den Ergebnissen von Thomsen et al. 2000 (*J Anim Breed Genet* 117, 289-306) verglichen, der diese Familien bereits für 10 weitere Marker auf BTA 6 (Mikrosatellitenmarker) typisiert und eine Kopplungskarte erstellt hat. Die Typisierungsdaten für *CSN1S1* werden in diesen bestehenden Datensatz integriert. Die Kartierung unter Verwendung der Funktion BUILD des Programmpaketes CRI-MAP (Version 2.4; Green et al. 1990, Documentation of CRI-MAP, Washington School of Medicine, St. Louis, MO, USA) führt zu zwei möglichen Positionen des Markers *CSN1S1*: zwischen den Markern IL97 und FBN14 oder FBN14 und CSN3. Die weiterhin durchgeführte FLIPS-Analyse führt zur endgültigen Kartierung von *CSN1S1* zwischen den Markern *FBN14* und *CSN3*. Die Gesamtlänge der mit den 11 Markern in den 8 Familien berechneten Kopplungskarte von BTA6 beträgt 161.1 cM. Die Position aller in die Kopplungskarte einbezogenen Marker und die vergleichenden Angaben aus den vorhandenen Genkarten MARC97 und IBRP97 zeigt die folgenden Tabelle 1. Dargestellt sind die Marker zur Erstellung der Kopplungskarte von BTA6, die Anzahl der informativen Meiosen und mit CRI-MAP berechnete Positionen (cM) auf der genetischen Karte (die erfindungsgemäße Karte ist mit „ADR“ bezeichnet) im Vergleich zu den beiden veröffentlichten Genkarten MARC97 and IBRP97. Für die mit n.a. eingetragenen Marker ist keine Kartierung in den jeweiligen Genkarten angegeben.

Marker	Informative	Position (cM)		
		ADR	MARC97	IBRP97
ILSTS93	193	0.0	0.0	16.0
ILSTS90	156	28.5	11.8	0.0
BM1329	141	56.8	35.5	45.0
URB16	228	57.9	n.a.	40.0
DIK82	356	78.5	n.a.	67.0
ILSTS097	78	99.6	67.2	89.0
FBN14	187	104.1	n.a.	n.a.
CSN1S1	280	108.1	(wie CSN3)	(wie CSN3)
CSN3	102	113.5	82.6	103.0
BP7	208	123.6	91.2	n.a.
BMC4203	186	161.1	112.9	n.a.

Tabelle 1

5. Varianzanalyse zur Schätzung von Effekten auf Milchleistungsmerkmale

- Mittels des erfindungsgemäßen Verfahren werden insgesamt 729 Bullen aus 9
- 5 Halbgeschwisterfamilien der Rassen Deutsch Holstein und Simmental mit dem Marker *CSN1S1* typisiert. Die Verteilung der Genotypen in den 9 Halbgeschwisterfamilien zeigt Tabelle 2.

Familie	n	CSN1S1 Genotyp							
		12	13	14	22	23	24	33	34
1	19	-	-	-	9	10	-	-	-
2	108	48	5	5	37	9	4	-	-
3	106	4	-	3	40	10	37	-	12
4	27	12	3	2	-	10	-	-	-
5	12	-	1	-	5	5	-	1	-
6	27	-	-	-	9	16	1	1	-
7	55	1	-	1	22	4	23		4
8	56	4	2	-	26	17	3	1	3
9	319	10	-	-	250	50	9		-
total	729	79	11	11	398	131	77	3	19

Tabelle 2

Die Zuchtwerte der Bullen werden zentral durch die Vereinigten Informationssysteme Tierhaltung (VIT) in Verden geschätzt. Insgesamt gehen über 150.000 Töchter und deren Leistungsdaten in die Zuchtwertschätzung ein. Von allen Bullen werden deregressierte Zuchtwerte für die Milchmenge, Protein- und Fettmenge, Proteingehalt (in %) und Fettgehalt (in %) in der Varianzkomponentenschätzung verwendet. Die Deregression der Zuchtwerte erfolgt wie bei Thom-
5 sen et al. (2001, *J Anim Breed Genet.* 118, 357-370) beschrieben.

Die Varianzkomponentenschätzung wird mit dem Programmpaket SAS durchgeführt. Als einziger fixer Effekt wird zunächst der Marker CSN1S1 im Modell
10 berücksichtigt, da andere Einflussfaktoren (z.B. Betriebseffekte, Melkhäufigkeit) bereits im Rahmen der Zuchtwertschätzung korrigiert werden. Die Analyse ergibt signifikante Effekte des Markers CSN1S1 auf alle untersuchten Merkmale (deregressierte Zuchtwerte für Proteingehalt (DRG_PP), Milchmenge (DRG_MY1), Fettmenge (DRG_FY1), Proteinmenge (DRG_PY1), Fettgehalt (DRG_FP)).
15 Tabelle 3 zeigt den Effekt von CSN1S1 auf deregressierte Zuchtwerte für Milchleistungsmerkmale mit Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) für die Effekte auf die Einzelmerkmale.

Merkmal	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
DRG-PP	< 0.0001
DRG_MY1	0.0011
DRG_FY1	0.0016
DRG_PY1	0.0056
DRG_FP	0.0052

Tabelle 3

Die höchste Signifikanz wird für den Effekt auf DRG_PP berechnet. Da der
20 untersuchte Marker CSN1S1 direkt im regulatorischen Bereich eines Milchproteingens liegt, könnte dies ein Hinweis auf einen direkten Effekt sein. Der Marker CSN1S1 erfüllt die Anforderungen an ein funktionelles Kandidatengen.

Die höchsten Zuchtwerte für Milchmenge (DRG_MY1) erzielen im Mittel Bullen mit dem Genotyp 12, wohingegen die höchsten Zuchtwerte für Proteingehalte
25 (DRG_PP) in der Gruppe mit Genotyp 24 gefunden werden. Eine Zusammenstel-

lung der *Least square* Mittelwerte (LS_means) für die Gruppen mit den Genotypen 12, 22, 23, und 24 zeigt Tabelle 4. Dargestellt sind die LS_means sowie Standardfehler für die deregressierten Zuchtwerte für Milchmenge (DRG_MY1) und Proteingehalt (DRG_PP) in Gruppen mit verschiedenen *CSN1S1* Genotypen.

CSN1S1 type	n	LSMEAN \pm se	
		DRG_MY1	DRG_PP
12	79	198.232 \pm 15.700	- 0.00022534 \pm 0.00006470
22	398	155.341 \pm 6.995	- 0.00037495 \pm 0.00002921
23	131	138.806 \pm 12.192	- 0.00038405 \pm 0.00005271
24	76	112.364 \pm 16.007	0.00008175 \pm 0.00006650
Alle	684	152.353	-0.000307

5 Tabelle 4

Zur genaueren Abklärung wird die Varianzanalyse innerhalb einzelner Familien und Gruppen von Familien mit denselben Genotypen erneut durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass der Effekt auf die Milchmenge nicht in allen Familien bestätigt werden kann. In Familie 9, in welcher vom Vater ausschließlich das Allele 2
 10 vererbt wird, ist der einzige verbleibende Effekt in der Nähe der 5% Signifikanzschwelle für DRG_PP zu finden ($p = 0.0610$). Weiterhin wird für alle Genotypgruppen und einzelne Familien ein Vergleich der LS-means für die Merkmale DRG_MY1, DRG_PP, DRG_FP durchgeführt und die Differenz der LS-means für die Genotypen 12, 23 und 24 zum häufigsten Genotyp 22 auf Signifikanz geprüft.
 15 Die Ergebnisse sind grafisch dargestellt in Abbildung 5.

6. Allelische Variabilität im Schaf

Genomische DNS von verschiedenen europäischen Schafrassen (Milch- und Fleischschaf) wird als Template zur Amplifikation der *CSN1S1*-5' Region wie
 20 vorher beschrieben eingesetzt und eine SSCP-Analyse durchgeführt, wobei 5 verschiedene Migrationsmuster auftreten, die dem Migrationsmuster von DNS aus Rindern sehr ähnlich sind (Daten nicht gezeigt).

Ansprüche

1. Genetischer Marker am 5'-Ende des α S1-Kaseingens dadurch gekennzeichnet,
dass er die Nukleotidsequenz 1 – 1061, bevorzugt die Nukleotidsequenz 1 –
5 655 am 5'-Ende des α S1-Kaseingens beinhaltet.
2. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er
durch die
Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')
Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')
10 oder durch die
Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')
Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')
in der PCR-Reaktion amplifiziert wird.
3. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er
15 innerhalb von Milchrassen variabel ist.
4. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er
zur Bestimmung des allelischen Zustandes am 5'-Ende des α S1-
Kaseingens verwendet wird.
5. Verfahren zur Ermittlung des allelischen Zustands des 5'-Ende des α S1-
20 Kaseingens, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte,
 - a) Bereitstellen des Ausgangsmaterials des zu untersuchenden Organismus
 - b) Isolierung des genetischen Materials
 - c) Gezielte Isolierung oder Anreicherung des Markerabschnittes des 5'-
Bereiches α S1-Kaseingens oder einer Sequenz, die Teilbereiche des Mar-
kerabschnittes, vorzugsweise den Abschnitt 1 bis 655 der Markersequenz
25 aus dem α S1-Kaseingen enthält
 - d) Nachweis des allelischen Zustands im isolierten oder angereicherten Se-
quenzbereich des Markerabschnitt des α S1-Kaseingens.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass, das Ausgangsmaterial aus einem Tier, insbesondere einem Säugetier, im besonderen einem Rind, einem Schaf oder einer Ziege einschließlich Zuchttieren und Embryonen dieser Spezies stammt.
- 5 7. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass, das Ausgangsmaterial Blut, Leukozyten, Gewebe einschließlich Biopsiematerial, Milch, Sperma, Haare, einzelne Zellen einschließlich Zellmaterial aus Embryonen, eine Bakterienkultur oder auch isolierte Chromosomen ist.
- 10 8. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass das Ausgangsmaterial aus einem gentechnisch veränderten Organismus (GVO) stammt, der den Markerabschnitt des α s1-Kaseingens enthält.
9. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass das genetische Material genomische DNS oder RNS von Tieren, Plasmid-DNA aus Bakterien, von artifiziellen Chromosomen wie BACs und YACs ist.
- 15 10. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass die Anreicherung des Markerabschnittes des α s1-Kaseingens mittels Polymerase-Kettenreaktion erfolgt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass die Anreicherung des Markerabschnittes des α s1-Kaseingens in der Polymerase-Kettenreaktion mit den Oligonukleotiden
- 20 Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')
- Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')
- Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')
- als Primer erfolgt, wobei die Kombination Primer 1 mit Primer 2 und Primer 2 mit Primer 3 gewählt werden.
- 25 12. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch dass die Bestimmung des allelischen Zustands mittels SSCP, RFLP, OLA, TGGE, ASPCR, PCR-ELISA, Microarray-Verfahren oder durch Nukleinsäuresequenzierung erfolgt.

13. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das einer oder mehrere der allelischen Zustände der Markersequenz des α s1-Kaseingens nachgewiesen werden
- 5 14. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur alters- und laktationsunabhängigen Untersuchung von Tieren auf Milchleistungsmerkmale.
- 15 15. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur Auswahl von Organismen, die eine bestimmte allelische Form oder einen bestimmten Genotyp der Markersequenz des α s1-Kaseingens oder eines Teilbereiches derer tragen.
- 10 16. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche in Zuchtprogrammen, insbesondere zur markergestützten Selektion.
17. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen Ansprüche zur Selektion auf erhöhte Milchproteingehalte.
- 15 18. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Genomanalyse, insbesondere zur Genkartierung und/oder Kopplungsanalyse.
19. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Erzeugung von Expressionsvektoren.
- 20 20. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Herstellung transgener Tiere.
- 25 21. Testkit, enthaltend Oligonukleotide zur Anreicherung eines Teilbereiches der Markersequenz des α s1-Kaseingens, vorzugsweise die Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3'), Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3') und Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3') sowie Referenzproben für eine oder mehrere Sequenzen der Markersequenz des α s1-Kaseingens und dessen Allele.

▼ markiert den Beginn des Exon 1

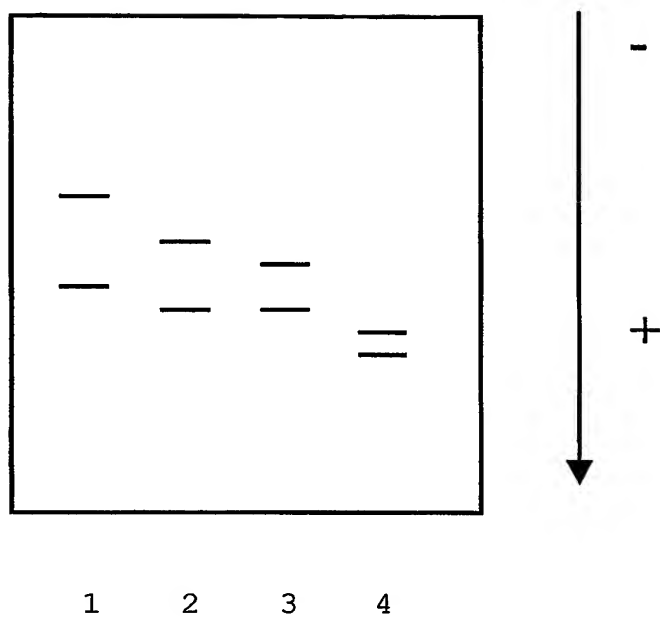
Abbildung 2

Sequenzalignment der 4 Allele
 Variationen in Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durch Kästen markiert

	10	20	30	40	50	
Allel_1	1 GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allel_2	1 GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allel_3	1 GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allel_4	1 GAATGAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
	60	70	80	90	100	
Allel_1	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAATTTATAC	AATAATTGTA	100
Allel_2	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAATTTATAC	AATAATTGTA	100
Allel_3	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAATTTATAC	AATAATTGTA	100
Allel_4	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAATTTATAC	AATAATTGTA	100
	110	120	130	140	150	
Allel_1	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
Allel_2	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
Allel_3	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
Allel_4	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACTTATTTT	150
	160	170	180	190	200	
Allel_1	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTAAAAG	200
Allel_2	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTAAAAG	200
Allel_3	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTAAAAG	200
Allel_4	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAAGTGA	GTTTTAAAAG	200
	210	220	230	240	250	
Allel_1	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAATT	250
Allel_2	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAATT	250
Allel_3	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAATT	250
Allel_4	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATGGT	CTTGTATGTT	AATAAAAATT	250
	260	270	280	290	300	
Allel_1	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTCTT	TTACAGGTAT	300
Allel_2	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTCTT	TTACAGGTAT	300
Allel_3	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTCTT	TTACAGGTAT	300
Allel_4	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTTGTCCCA	AGAATTTCTT	TTACAGGTAT	300
	310	320	330	340	350	
Allel_1	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allel_2	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allel_3	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allel_4	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
	360	370	380	390	400	
Allel_1	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTT--GTTT	400
Allel_2	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTTGTTT	400
Allel_3	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTT----	400
Allel_4	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTT----	400
	410	420	430	440	450	
Allel_1	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCGCTTCTT	450
Allel_2	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCACTTCTT	450
Allel_3	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCACTTCTT	450
Allel_4	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTT	CTGTATAATG	AGTCACTTCTT	450
				AP-1		
				YY-1		
	460	470	480	490	500	
Allel_1	451 TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allel_2	451 TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allel_3	451 TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allel_4	451 TGTTGTAAA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500

ABF1

	510	520	530	540	550	
Allel_1	501	TGATTTCCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTATTGGTTA 550
Allel_2	501	TGATTTCCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA 550
Allel_3	501	TGATTTCCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA 550
Allel_4	501	TGATTTCCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA 550
	560	570	580	590	600	
Allel_1	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT 600
Allel_2	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT 600
Allel_3	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT 600
Allel_4	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT 600
	610	620	630	640	650	
Allel_1	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT 650
Allel_2	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT 650
Allel_3	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT 650
Allel_4	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT 650
	660	670	680	690	700	
Allel_1	651	TCTT				
Allel_2	651	TCTT				
Allel_3	651	TCTT				
Allel_4	651	TCTT				

Abbildung 3

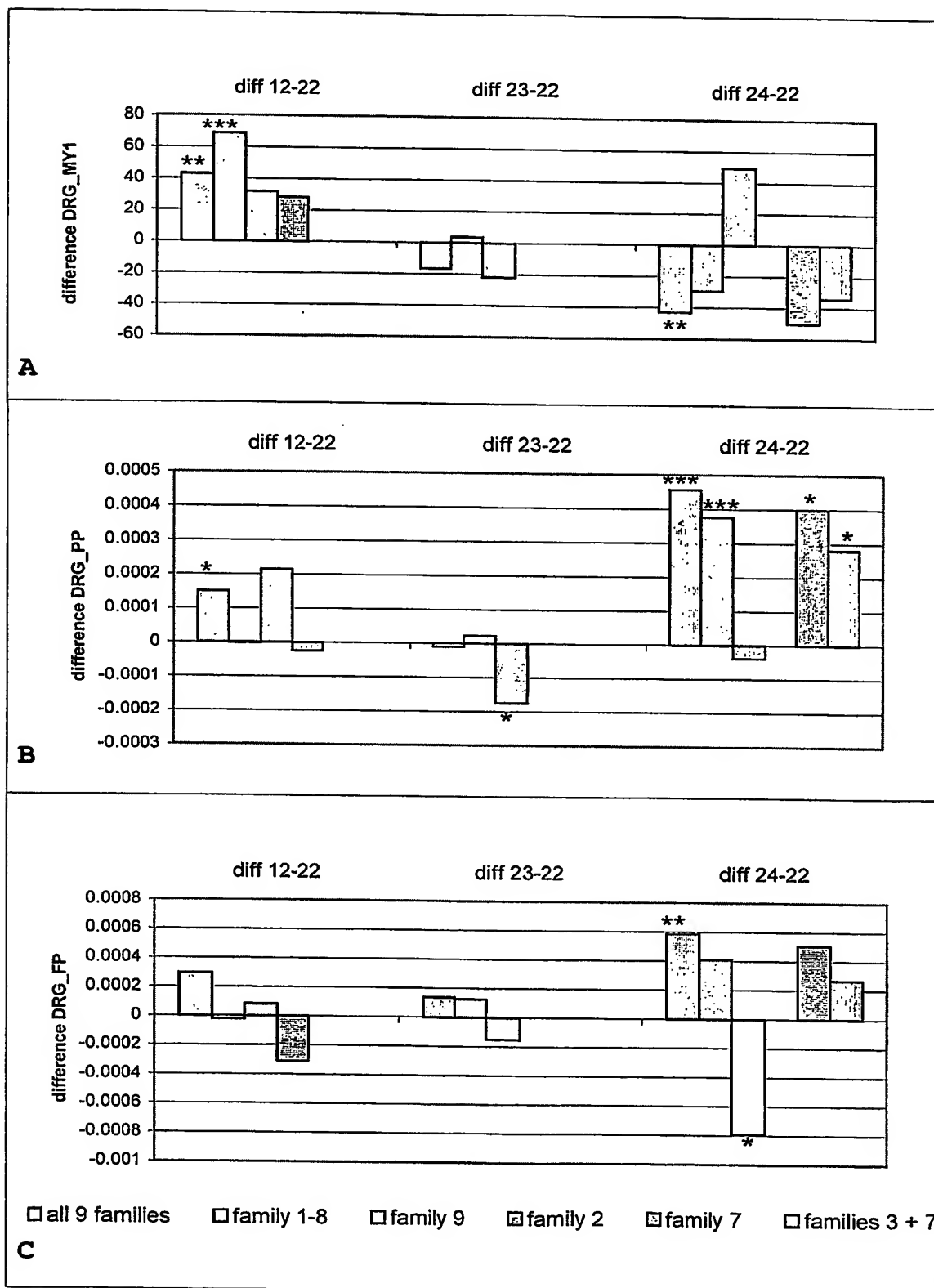


Abbildung 4

Prinzenberg_Sequenzen.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> TransMIT Gesellschaft für Technologietransfer mbH

<120> Verfahren zur Bestimmung des allelischen Zustandes am 5'-Ende des
alphaS1-Kaseingens

<130> An127/Pri

<140> DE 102 38 433.9

<141> 2002-08-16

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Bos spec.

<220>

<221> Primer1

<222> (1)..(20)

<223> Länge: 20 Basenpaare
Art: Nukleinsäure
Strangform: einzel
Topologie: linear

<400> 1
gaatgaatga actagttacc

20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Bos spec.

Prinzenberg_Sequenzen.ST25

<220>

<221> Primer 2

<222> (1)..(18)

<223> Länge: 18 Basenpaare
Art: Nukleinsäure
Strangform: einzel
Topologie: linear

<400> 2
gaagaagcag caagctgg

18

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Bos spec.

<220>

<221> Primer 3

<222> (1)..(19)

<223> Länge: 19 Basenpaare
Art: Nukleinsäure
Strangform: einzel
Topologie: linear

<400> 3
ccttgaaata ttctaccag

19

<210> 4

<211> 1061

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> alpha-S1kaseingen

<222> (1)..(1061)

<223> Beginn Exon 1 bei Position 620

<300>

<301> Koczan Dirk, Hobom Gerd, Seyfert Hans-Martin

Prinzenberg_Sequenzen.ST25

<302> Genomic organization of the bovine alpha S1-casein gene

<303> Nucleic acids research

<304> 19

<305> 20

<306> 5591

<307> 1991-09-24

<308> X59856

<309> 1991-07-18

<313> (1)..(1061)

<300>

<308> EMBL X59856

<309> 1991-07-18

<313> (1)..(1061)

<400> 4

```

gaatgaatga actagttacc acaactagta cacccaaaat gaacaaaaaa tagcttggtg      60
gtataattaa aatgccacca aaattttatac aataattata ttttcttttt gcaggaaaaa    120
gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataatatg    180
gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggt cttgtatggt    240
aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcat ttacaggtat    300
tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa    360
taaccataaa tctaggggtt tggtgggggt tttttttggt tgtaattta gaacaatgcc    420
attccatttc ctgtataatg agtcacttct ttgttgtaaa ctctccttag aatttcttgg    480
gagaggaact gaacagaaca ttgatttcct atgtgagaga attccttagaa tttaaataaa    540
cctgttggtt aaactgaaac cacaaaatta gcattttact aatcagtagg tttaaatagc    600
ttggaagcaa aagtctgcc aacacctgat catcaacca gcttgctgct tcttcccagt    660
cttgggttca aggtattatg tatacatata acaaaatttc tatgattttc ctctgtctca    720
tctttcattc ttcactaata cgcagttgta acttttctat gtgattgcaa gtattggtac    780
tttcctatga tatactgtta gcttaaaaat atatttgcaa atgttgatac tatctatctc    840
agagctatag gtgaaaaatt aaatactttt ataaagacca aattgatcat ttttaaacga    900
aattcttata tactgaaaat gtagatacat aacttcagta tagatttatg gtaaaataat    960
ttgaatcatt tttgtcaaat tctgtaaaaa gttgtcatac agaataattt ataataattt   1020
tgttttcata gaaataacat ttctggtaga atatttcaag g                               1061

```

Prinzenberg_Sequenzen.ST25

<210> 5

<211> 652

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CSN1S1-Gen, 5`flankierende Region bis Position 616 und Exon 1 ab Position 617

<222> (1)..(652)

<223> Mutation/SNP Position 83 (A zu G), Position 98 (A zu G), Position 298 (A zu C), Position 442 (A zu G; Änderung/Verlust einer YY1- und AP1-Bindungsstelle), Position 541 (G zu A);
 Deletion TT zwischen Position 389 und 394 verglichen mit Allel2

<400> 5

```

gaatgaatga actagttacc acaactagta caccctaaat gaacaaaaaa tagcttggtg      60
gtataattaa aatgccacca aagtttatac aataattgta ttttcttttt gcaggaaaaa     120
gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataatatg     180
gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggt cttgtatggt     240
aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcct ttacaggtat     300
tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa     360
taaccataaa tctaggggtt tggtgggggt ttttgtttgt taatttagaa caatgccatt     420
ccatttcctg tataatgagt cgcttctttg ttgtaaactc tccttagaat ttcttgggag     480
aggaactgaa cagaacattg atttcctatg tgagagaatt cttagaattt aaataaacct     540
attggttaaa ctgaaaccac aaaattagca ttttactaat cagtagggtt aaatagcttg     600
gaagcaaaag tctgccatca ccttgatcat caaccagct tgctgctttc tt              652

```

<210> 6

<211> 654

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CSN1S1-Gen, 5`flankierende Region und Exon 1

<222> (1)..(654)

<223> Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor AP-1 bei Position 438 bis 445
 Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor YY-1 bei Position 443 bis 448

Prinzenberg_Sequenzen.ST25

<400> 6
 gaatgaatga actagttacc acaactagta cacccaaaat gaacaaaaaa tagcttggtg 60
 gtataattaa aatgccacca aaattttatac aataattata ttttcttttt gcaggaaaaa 120
 gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataaatatg 180
 gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggt cttgtatggt 240
 aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcac ttacaggtat 300
 tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa 360
 taaccataaa tctaggggtt tggtgggggt ttttttggtt gtttaatttag aacaatgccca 420
 ttccattttc tgtataatga gtcacttctt tggtgtaaac tctccttaga atttcttggg 480
 agaggaactg aacagaacat tgatttccta tgtgagagaa ttcttagaat ttaaataaac 540
 ctggttggtta aactgaaacc acaaaattag cattttacta atcagtaggt ttaaataagct 600
 tggaagcaaa agtctgccat caccttgatc atcaaccag cttgctgctt tctt 654

<210> 7

<211> 650

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CSN1S1-Gen, 5' flankierende Region

<222> (1)..(650)

<223> Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor AP-1 bei Position 434 bis
 441
 Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor YY-1 bei Position 439 bis
 444
 Deletion G und TTT zw. 390 und 396 verglichen mit Allel 2

<400> 7
 gaatgaatga actagttacc acaactagta cacccaaaat gaacaaaaaa tagcttggtg 60
 gtataattaa aatgccacca aaattttatac aataattata ttttcttttt gcaggaaaaa 120
 gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataaatatg 180
 gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggt cttgtatggt 240
 aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcac ttacaggtat 300
 tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa 360
 taaccataaa tctaggggtt tggtgggggt ttttttggtt atttagaaca atgccatttc 420
 atttcctgta taatgagtca cttctttggt gtaaactctc cttagaattt cttgggagag 480

Prinzenberg_Sequenzen.ST25

```

gaactgaaca gaacattgat ttcctatgtg agagaattct tagaatttaa ataaacctgt      540
tggttaaact gaaaccacaa aattagcatt ttactaatca gtaggtttaa atagcttgga      600
agcaaaagtc tgccatcacc ttgatcatca acccagcttg ctgctttctt      650

```

<210> 8

<211> 650

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CSN1S1-Gen, 5`flankierende Region

<222> (1)..(650)

<223> Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren: AP-1 bei Position 434 bis 441, ABF1 bei Position 469 bis 483, YY-1 bei Position 439 bis 444;
 Mutation (SNP) in Position 480 (G zu C), damit entsteht eine ABF1-Bindungsstelle;
 Deletion G und TTT zwischen Position 390 und 396 verglichen mit A11e1 2

<400> 8

```

gaatgaatga actagttacc acaactagta caccctaaat gaacaaaaaa tagcttggtg      60
gtataattaa aatgccacca aaatttatac aataattata ttttcttttt gcaggaaaaa      120
gattagacca catataatgt aacttatttc acaaggtaaa taattataat aaataaatatg      180
gattaactga gttttaaaag gtgaaataaa taatgaattc ttctcatggg cttgtatggt      240
aataaaaatt gaaaaatttt gaagacccca ttttgtccca agaatttcat ttacaggtat      300
tgaatttttc aaagggttaca aaggaaattt tattgatata ataaatgcat gttctcataa      360
taaccataaa tctagggttt tgttgggggt ttttttggtt atttagaaca atgccattcc      420
atttcctgta taatgagtca cttctttggt gttaaactctc cttagaattt cttgggagac      480
gaactgaaca gaacattgat ttcctatgtg agagaattct tagaatttaa ataaacctgt      540
tggttaaact gaaaccacaa aattagcatt ttactaatca gtaggtttaa atagcttgga      600
agcaaaagtc tgccatcacc ttgatcatca acccagcttg ctgctttctt      650

```

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. März 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/018696 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002747
(22) Internationales Anmeldedatum:
15. August 2003 (15.08.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD, GE, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, SC, SG, SY, TN, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA.

(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität:
102 38 433.9 16. August 2002 (16.08.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): TRANSMIT GESELLSCHAFT FÜR TECHNOLOGIETRANSFER MBH [DE/DE]; Kerkrader Strasse 3, 35394 Giessen (DE); JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN [DE/DE]; Ludwigstrasse 23, 35390 Giessen (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): PRINZENBERG, Eva-Maria [DE/DE]; Eisenstein 29, 35396 Giessen (DE). ERHARDT, Georg [DE/DE]; Bahnhofstrasse 93, 35415 Pohlheim (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 3. Juni 2004

(74) Gemeinsamer Vertreter: TRANSMIT
GESELLSCHAFT FÜR TECHNOLOGIETRANSFER MBH; Kerkrader Strasse 3, 35394 Giessen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE ALLELIC STATE OF THE 5'-END OF THE α S1-CASEIN GENE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES ALLELISCHEN ZUSTANDES AM 5'-ENDE DES α S1-KASEIN-GENS

(57) Abstract: The invention relates to a genetic marker on the 5'-end of the α S1-casein gene (CSN1S1) and of the casein gene-complex and a method for the age and lactation independent typing of cows by determining the allelic state in said area. The invention also relates to the use of said method for selecting organisms having a preferred allele, for example, in marker-assisted selection.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen genetischen Marker am 5'-Ende des α S1-Kaseingens (CSN1S1) und des Kaseingen-Komplexes und ein Verfahren zur alters- und laktationsunabhängigen Typisierung von Rindern durch Bestimmung des allelischen Zustands in diesem Bereich, sowie die Verwendung dieses Verfahrens zur Auswahl von Organismen mit einem bevorzugten Allel, beispielsweise in der markergestützten Selektion.

WO 2004/018696 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 03/02747

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOCZAN D ET AL: "GENOMIC ORGANIZATION OF THE BOVINE ALPHA-S1 CASEIN GENE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 19, no. 20, 1991, pages 5591-5596, XP002915050 ISSN: 0305-1048 abstract; figure 1	1,2
X	ANIMAL SCIENCE PAPERS AND REPORTS, vol. 17, no. 1, 1999, pages 29-33, XP0001179556 ISSN: 0860-4037 abstract pages 30-32; figure 1	5-7,10,12,13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2004

Date of mailing of the international search report

31/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Leber, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 03/02747

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF ANIMAL AND FEED SCIENCES, vol. 9, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 73-79, XP0001179557 ISSN: 1230-1388 the whole document	5-7, 9, 10, 12, 13
X	THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 93, no. 5-6, 1996, pages 887-893, XP0009026049 ISSN: 0040-5752 the whole document	5-7, 9, 10, 12, 13
Y		14-21
Y	JOURNAL OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, vol. 114, no. 2, 1997, pages 121-132, XP0009026048 ISSN: 0931-2668 abstract; tables 1, 4 page 131	14-21
Y	US 4 873 316 A (MEADE HARRY ET AL) 10 October 1989 (1989-10-10) abstract column 2, lines 40-68 examples 1-4	14-21
A	DATABASE EMBL 'Online! XP002273453 retrieved from HTTP://WWW.EBI.AC.UK/ Database accession no. X59856 the whole document	
A	GENE (AMSTERDAM), vol. 126, no. 2, 1993, pages 213-218, XP0001179551 ISSN: 0378-1119	
A	JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 70, no. 12, 1987, pages 2585-2598, XP0009026144 ISSN: 0022-0302	
A	ANIMAL GENETICS. FEB 1993, vol. 24, no. 1, February 1993 (1993-02), page 74, XP0009026055 ISSN: 0268-9146	
A	ARCHIV FUER TIERZUCHT, vol. 39, no. 4, 1996, pages 369-385, XP0009026150 ISSN: 0003-9438	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT 03/02747

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PRINZENBERG E.-M.: "Kapitel 2.4: "Züchterische Bedeutung genetisch bedingter Milchproteine" 1998, FACHVERLAG KÖHLER , XP0001179534 ISBN-3-922306-68-3 Seiten 14-21 -----	
A	PRINZENBERG E.-M.: "Kapitel 4.1: "alphaS1-Kaseingen" 1998, FACHVERLAG KÖHLER , XP0001179535 ISBN 3-922306-68-3 Seiten 61-73 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE0302747**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box I.2

Claim 1 relates to the nucleotide sequence 1-1061 or 1-655 at the 5' end of the alpha S1 casein gene. This wording is unclear (PCT Article 6), since neither the beginning of the 5' end is defined in relation to a known sequence (e.g. Genbank Acc. No. X59856, page 8, line 20 of the description), nor the exact sequence *per se*. To make a meaningful search possible, said phrases have been understood to relate to the sequences with numbers SEQ ID NO: 4-8 (page 7, lines 27 to 32, sequence listing).

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/03/02747

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4873316	A	10-10-1989	AT 128625 T 15-10-1995
			DE 3854555 D1 09-11-1995
			DE 3854555 T2 04-04-1996
			EP 0347431 A1 27-12-1989
			JP 2500798 T 22-03-1990
			JP 2898003 B2 31-05-1999
			WO 8810118 A1 29-12-1988
			US 2002129387 A1 12-09-2002
			US 5750172 A 12-05-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 03/02747

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOCZAN D ET AL: "GENOMIC ORGANIZATION OF THE BOVINE ALPHA-S1 CASEIN GENE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 19, Nr. 20, 1991, Seiten 5591-5596, XP002915050 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung; Abbildung 1	1,2
X	ANIMAL SCIENCE PAPERS AND REPORTS, Bd. 17, Nr. 1, 1999, Seiten 29-33, XP0001179556 ISSN: 0860-4037 Zusammenfassung Seiten 30-32; Abbildung 1	5-7,10, 12,13
	----- -/-- -----	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. März 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/03/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Leber, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF ANIMAL AND FEED SCIENCES, Bd. 9, Nr. 1, Januar 2000 (2000-01), Seiten 73-79, XP0001179557 ISSN: 1230-1388 das ganze Dokument	5-7,9, 10,12,13
X	THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, Bd. 93, Nr. 5-6, 1996, Seiten 887-893, XP0009026049 ISSN: 0040-5752 das ganze Dokument	5-7,9, 10,12,13
Y		14-21
Y	JOURNAL OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, Bd. 114, Nr. 2, 1997, Seiten 121-132, XP0009026048 ISSN: 0931-2668 Zusammenfassung; Tabellen 1,4 Seite 131	14-21
Y	US 4 873 316 A (MEADE HARRY ET AL) 10. Oktober 1989 (1989-10-10) Zusammenfassung Spalte 2, Zeilen 40-68 Beispiele 1-4	14-21
A	DATABASE EMBL 'Online! XP002273453 gefunden im HTTP://WWW.EBI.AC.UK/ Database accession no. X59856 das ganze Dokument	
A	GENE (AMSTERDAM), Bd. 126, Nr. 2, 1993, Seiten 213-218, XP0001179551 ISSN: 0378-1119	
A	JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, Bd. 70, Nr. 12, 1987, Seiten 2585-2598, XP0009026144 ISSN: 0022-0302	
A	ANIMAL GENETICS. FEB 1993, Bd. 24, Nr. 1, Februar 1993 (1993-02), Seite 74, XP0009026055 ISSN: 0268-9146	
A	ARCHIV FUER TIERZUCHT, Bd. 39, Nr. 4, 1996, Seiten 369-385, XP0009026150 ISSN: 0003-9438	

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PO 03/02747

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PRINZENBERG E.-M.: "Kapitel 2.4: "Züchterische Bedeutung genetisch bedingter Milchproteine" 1998, FACHVERLAG KÖHLER , XP0001179534 ISBN-3-922306-68-3 Seiten 14-21</p>	
A	<p>PRINZENBERG E.-M.: "Kapitel 4.1: "alphaS1-Kaseingen" 1998, FACHVERLAG KÖHLER , XP0001179535 ISBN 3-922306-68-3 Seiten 61-73</p>	

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden könnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1

Anspruch 1 bezieht sich auf die Nukleotidsequenz 1-1061 bzw. 1-655 am 5' Ende des *aphaSl*-Kaseingens. Diese Formulierung ist unklar (Art 6 PCT), da weder der Beginn des 5'-Endes im Bezug auf eine bekannte Sequenz (z.B. Genbank Acc. No. X59856, Seite 8, Linie 20 der Beschreibung) noch die genaue Sequenz per se definiert ist. Um dennoch eine sinnvolle Recherche zu ermöglichen, wurden besagte Ausdrücke als sich auf die Sequenzen mit den Nummern SEQ ID NO:4-8 beziehend verstanden (Seite 7, Zeilen 27-32, Sequenzliste).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC 03/02747

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4873316 A	10-10-1989	AT 128625 T	15-10-1995
		DE 3854555 D1	09-11-1995
		DE 3854555 T2	04-04-1996
		EP 0347431 A1	27-12-1989
		JP 2500798 T	22-03-1990
		JP 2898003 B2	31-05-1999
		WO 8810118 A1	29-12-1988
		US 2002129387 A1	12-09-2002
		US 5750172 A	12-05-1998